

Title	小分子ライブラリーを用いた関節軟骨の生体恒常性維持に関わる新規化合物の探索
Author(s)	柳, カヨン
Citation	令和元（2019）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書
Issue Date	2020-06
oaire:version	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/75982
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

2019年度大阪大学未来基金【住野勇財団】学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏 名	ゆう かよん 柳 カヨン	学部 学科	歯学部歯学科	学年	4 年
ふりがな 共 同 研究者氏名	うるしざき みつき 漆崎 海月	学部 学科	歯学部歯学科	学年	4 年
	きむら あやか 木村 綾花		歯学部歯学科		4 年
					年
アドバイザー教員 氏名	高畑 佳史	所属	歯学研究科 生化学教室		
研究課題名	小分子ライブラリーを用いた関節軟骨の生体恒常性維持に関わる新規化合物の探索				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				
<p>「研究目的」</p> <p>超高齢社会の到来に伴って変形性関節症をはじめとする関節疾患患者数が増加し、医学的あるいは医療経済学的にも大きな問題となりつつある。関節リウマチに対しては、抗 IL-6 抗体などの生物学的製剤の開発により効果的な治療法が確立されつつあるが、変形性関節症に対する薬剤治療法としてはヒアルロン酸の関節内注入療法や消炎鎮痛剤を用いる対症療法が行われているのみで、現状では症状のわずかな緩和・軽減しか期待できない。成長板を構成する軟骨細胞は増殖、肥大化に伴い分化が進行し、最終的に骨に置換される内軟骨骨形成に重要な役割を果たす一方で、関節軟骨細胞は、どの細胞を起源とするのか、どのような転写因子で分化が進行するのかについても未知である。細胞生理学的に関節軟骨は増殖性に乏しく、一度損傷を受け破壊されると、関節組織が自己修復することは困難であるため、IPS 細胞を用いた関節組織の再生を目指した研究も国内外を問わず活発に行われている。変形性関節症に対する科学的に有効な治療薬あるいは、関節軟骨に対して保護的に作用し変形性関節症の予防に役立つ薬剤を開発するためには、関節軟骨細胞の恒常性維持機構の理解と、関節軟骨の発生・分化の分子メカニズムの解明が急務である。</p> <p>Prg4 は軟骨表層の摩擦の軽減や衝撃の吸収に深く関与するプロテオグリカンコードする遺伝子であり、Prg4 ノックアウトマウスは野生型マウスに比べ、軟骨変性が引き起こされやすい (Ruan et al. 2013)。一方 Gdf5 は、関節組織の発生に重要なサイトカインであり、その自然変異マウスでは変形性関節症様の表現型を示す (Masuya et al. 2007)。したがって変形性関節症を始めとする関節疾患に対する新規の治療戦略を編み出すためには、Prg4 および Gdf5 遺伝子の発現制御機構を取っ掛かりとして、関節軟骨細胞の形成に関わる新規分子基盤の理解が必要である。研究の戦略としては、低分子化合物ライブラリーから Prg4 や Gdf5 の発現を制御する物質の探索を通してその化合物の薬理作用を解明することで、Prg4, Gdf5 の発現制御に関わる細胞内シグナル伝達機構と関節軟骨の発生・分化メカニズムおよび関節保護に関わる遺伝子など重要な知見が得られることが期待される。<u>本研究計画では、基礎配属実習で学んだ Cas9 ゲノム編集による遺伝子改変技術を応用して、ハイスループットアクセスに利用できるマウスを作出し、新規薬剤開発のためのスクリーニング技術の構築と新規化合物の</u></p>					

創出を目指す。

「研究方法」

1. Prg4 および遺伝子に対する HiBiT のノックイン (KI) マウスの作出

HiBiT は大きさがわずか 11 アミノ酸であり、LgBiT と高い親和性で結合して NanoLuc を構成し、基質と反応することで、強い発光を生じる新規システムである。非常に強い発光のためタンパク質を過剰発現させる必要がなく、内在性レベルで発現する目的タンパク質の定量化が可能であり、CRISPR/Cas9 等のゲノム編集技術と組み合わせて HiBiT タグを挿入し目的タンパク質のモニタリングを行うことでハイスループットアッセイが可能である。本研究では Prg4 および Gdf5 遺伝子の発現制御機構を詳細に解明するために、Prg4, Gdf5 の C 末端部位に HiBiT を挿入したノックインマウスの作出を試みた。具体的には、TAKE 法に準じて、当該遺伝子の終止コドン間近の上流に HiBiT タグを含む短い 1 本鎖 DNA (ssODN) をノックインした。Cas9 タンパク質、crRNA、tracrRNA、ssODN を Opti-MEM に混和し、エレクトロポレーションにて C57BL6/J マウス前核期受精卵に導入した。20 時間培養後、2 細胞期に達したマウス胚を ICR 偽妊娠マウスに卵管移植し、HiBiT KI マウスを樹立した。

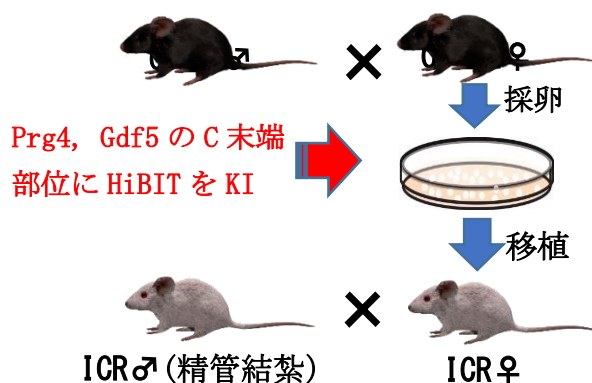
2. Prg4, および Gdf5 遺伝子の発現制御機構の解明

Prg4 および Gdf5 の発現調節に関わる因子は、関節軟骨の発生と恒常性維持に重要であると考えられるので、その発現を促進する生理活性物質または低分子化合物を検索するスクリーニングシステムを構築することを試みた。具体的には 1. で作出した KI マウスから Prg4 または Gdf5 を特異的に発現する関節軟骨表層細胞を単離し、低分子化合物ライブラリーを作用させ、ルシフェラーゼによる発光を増加させる低分子化合物を探索した。この生物学的に有意義なハイスループットスクリーニングシステムを用いることで、Prg4 および Gdf5 の発現を誘導する生理活性物質あるいは低分子化合物を同定する。さらに同定した化合物の標的受容体、シグナル伝達機構および薬理作用の解明を通して Prg4 および Gdf5 の発現制御に関わる主要なシグナル経路を明らかにすることを考えた。以上の実験を通して Prg4 および Gdf5 の発現調節に関わる標的分子が明らかになれば、変形性関節症治療に対する新規治療薬の開発に貢献すると期待できる。

「研究経過」

1. Prg4 および遺伝子に対する HiBiT のノックイン (KI) マウスの作出

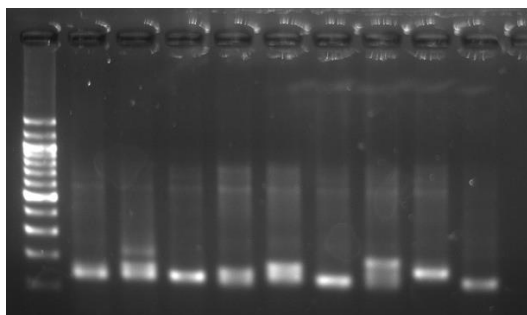
過排卵処置を施した C57BL6/J マウスを自然交配させ受精卵を採取した。続いて、得られた受精卵に対して、TAKE 法により HiBiT タグを含む短い 1 本鎖 DNA (ssODN)、Cas 9 タンパク質、crRNA、tracrRNA を Opti-MEM に混和し、エレクトロポレーションにて細胞内に導入した。20 時間培養後、2 細胞期に達したマウス胚を ICR 偽妊娠マウスに卵管移植した。



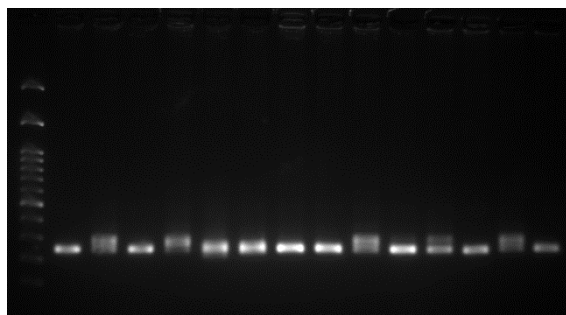
移植から 19 日後に帝王切開を行い、GDF HiBiT ノックインマウスは 9 匹、Prg4 HiBiT ノックインマウスは 14 匹得ることができた。引き続き、マウス胎児の組織片から DNA を採取し、GDF HiBiT(A) と

Prg4 HiBiT(B)が正しくノックインできているかどうか検討するために PCR 法にて遺伝子判定を行った。この結果、GDF5-HiBiT は左から 2 番、4 番、5 番、7 番、Prg4-HiBiT は左から 2 番、4 番、9 番、11 番、13 番のサンプルにて HiBiT がノックインされた PCR 産物の長さに相当する DNA 断片が検出できた。さらに、これらの PCR 産物の DNA シーケンスを解析した結果、GDF HiBiT(C)と Prg4(D)の両方にノックインが確認された。

(A)

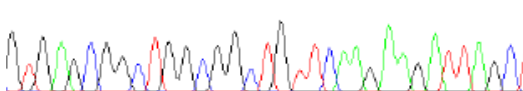


(B)



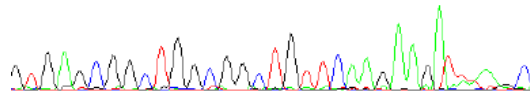
(C)

40 50 60 70
GTGAGCGGCTGGCGGCTGTTCAAGAAGATTAGC



(D)

400 410 420
GTGAGCGGCTGGCGGCTGTTCAAGAAANNNAAGC



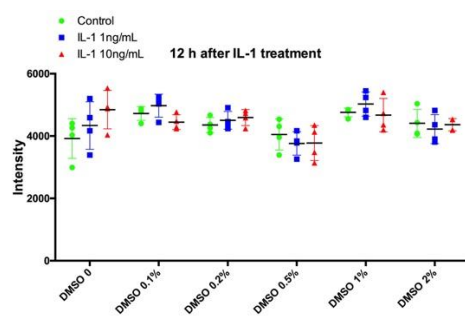
2. Prg4, および Gdf5 遺伝子の発現制御機構の解明

1 で作成した KI マウスから Prg4 を特異的に発現する大腿骨膝関節の軟骨表層細胞 (superficial zone cell ; SFZ cell) を採取した。生後 3 日齢マウスの膝関節を切断し、顕微鏡下で脛骨先端部、大腿骨頭部の関節部位を採取した。採取した軟骨組織を 0.25%トリプシン/HBSS 緩衝液で 1 時間処理した後に、0.25%コラゲナーゼ/DMEM 培地にて酵素処理を行った。分散された軟骨細胞を Human Fibronectin Cellware 100mm dish に培養し、ディッシュに接着した細胞のみ選別した。次に細胞がサブコンフレントの状態に達したら、細胞を継代し、96well plate に 17×10^3 cells の細胞密度になるように播種した。

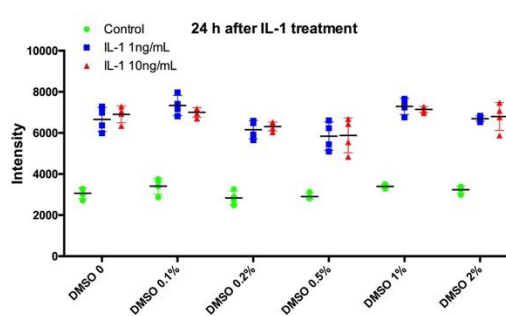
化合物ライブラリーは DMSO 溶媒に溶解しているために、DMSO 自体の毒性の影響について検討を行った。Prg4 の発現を上昇させるポジティブコントロールに IL-1 を用いた。DMSO 濃度を 0%、0.1%、0.2%、0.3%、0.5%、1%、2%それぞれに対して、IL-1 を 0ng/mL、1ng/mL、10ng/mL ずつ加え、SFZ cell への刺激を加え、時間条件を振って条件の検討を行った。

発光の測定は Promega 社の HiBiT Lytic enzyme を用い、添付のマニュアルの記載に従い、HiBiT Lytic buffer に対して 50:1 の HiBiT Lytic Substrate と 100:1 の LgBiT Protein を混合し、1well に対して $20 \mu\text{L}$ の試薬を加え、発光を測定した。発光の測定は IL-1 を添加後 12 時間 (E)、24 時間 (F)、48 時間 (G) で行った。この結果、IL-1 による発光強度の増強は 24 時間後のみで観察され、12 時間後、48 時間後では発光の増加は見られなかった。この結果は 12 時間後では、IL-1 による Prg4 発現上昇の効果が現れるまでの時間が短く、48 時間後では DMSO の影響を受けたため IL-1 による発現増加が見られなかったと考える。

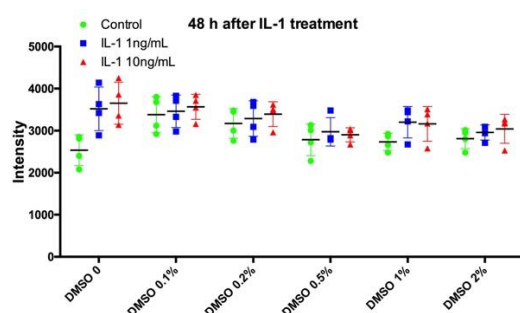
(E)



(F)



(G)



「研究成果」

現時点での本研究での成果は、スクリーニングシステムを実施するための遺伝子改変マウスの作出に成功したことである。実際に、Gdf5-HiBiT と Prg4-HiBiT のノックインマウスが正しく系統として樹立できたことは今後の解析に非常に有用なマテリアルとして応用できるため、本研究の大きな前進に寄与している。例えば、本研究で利用したように、マウス組織から細胞を採取して当該遺伝子の発現をタンパクレベルでモニタリングすることが可能になった。また HiBIT タグによって特異的に発現する部位を発光を用いて in vivo イメージングすることが可能である。

本研究では、低分子化合物ライブラリーを作用させるにあたり、Prg4 発現を誘導する条件をある程度絞り込むことができた。特に DMSO の暴露時間が最も影響を受けやすい因子であることが示唆されたため、薬剤刺激後 24 時間でスクリーニングを行うことが適切であると考えられる。また、DMSO 濃度が 1%を超えると、IL-1 による発光の増加が減弱したため、薬剤濃度を DMSO 1%以下になるような条件にすることが適切であると考えられる。今後は、この条件下で化合物ライブラリーを作用させ、Prg4、Gdf5 遺伝子の発現に関与する新規化合物の探索と同定を行い、関節保護に関わる薬剤開発を目指したい。

「参考文献」

Ruan, M. Z. C., Erez, A., Guse, K., Dawson, B., Bertin, T., Chen, Y., et al. (2013). Proteoglycan 4 Expression Protects Against the Development of Osteoarthritis. *Science Translational Medicine*, 5(176), 176ra34–176ra34.

Masuya, H., Nishida, K., Furuichi, T., Toki, H., Nishimura, G., Kawabata, H., et al. (2007). A novel dominant-negative mutation in Gdf5 generated by ENU mutagenesis impairs joint formation and causes osteoarthritis in mice. *Human Molecular Genetics*, 16(19), 2366–2375.